



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類6 G01N 33/579, A61L 2/18</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO98/34119</p> <p>(43) 国際公開日 1998年8月6日(06.08.98)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00398</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月30日(30.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/18950 1997年1月31日(31.01.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 生化学工業株式会社(SEIKAGAKU CORPORATION)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 田村弘志(TAMURA, Hiroshi)[JP/JP] 〒208 東京都武蔵村山市中藤四丁目6-13 Tokyo, (JP) 田中重則(TANAKA, Shigenori)[JP/JP] 〒187 東京都小平市小川西町五丁目3-15 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)</p> | | <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: TREATMENT FOR SOLID SURFACE</p> <p>(54)発明の名称 固体表面の処理剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>1) A method for treating a solid surface, characterized by bringing a treatment containing a chelating agent and/or a surfactant as the active ingredients into contact with a solid surface having a Limulus reactive substance deposited or adsorbed thereon to thereby liberate said substance; 2) a treatment for a solid surface to be used for liberating a Limulus reactive substance from a solid surface having said substance deposited or adsorbed thereon, characterized by containing a chelating agent and/or a surfactant as the active ingredient; 3) the use of a treatment containing a chelating agent and/or a surfactant as the active ingredient for liberating a Limulus reactive substance from a solid surface having said substance deposited or adsorbed thereon; and 4) a method for assaying a Limulus reactive substance, characterized by allowing a Limulus reagent to act on a solution obtained by treating a solid surface having a Limulus reactive substance deposited or adsorbed thereon with a treatment containing a chelating agent and/or a surfactant as the active ingredient. The method enables simple and efficient liberation of a Limulus reactive substance deposited or adsorbed on the surface of a solid, such as a medical device or a container for drugs, in a hygienically safe and inexpensive manner.</p> | | |

(57) 要約

本発明は、1) リムルス反応性物質が付着又は吸着し固体表面にキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤を接触させ、リムルス反応性物質を遊離させることを特徴とする固体表面の処理方法、2) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面からリムルス反応性物質を遊離させるために用いられ、キレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有することを特徴とする固体表面の処理剤、3) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面から、リムルス反応性物質を遊離させる処理へのキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分とする処理剤の使用、4) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面をキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤で処理して得られた処理液にリムルス試薬を作用させることを特徴とするリムルス反応性物質の測定法に関し、医療用具、医薬品容器等の固体表面に付着又は吸着したリムルス反応性物質を簡便かつ効率良く遊離させ得る衛生上安全で低価格な方法、その方法に用いる処理剤、その処理剤の使用とそれを用いたリムルス反応性物質の測定法を提供するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|----------|----|--------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LV | ラトヴィア | SD | スーダン |
| AT | オーストリア | GB | 英国 | MC | モナコ | ST | セント・トメ・プリンシペ |
| AZ | アゼルバイジャン | GE | グルジア | MD | モルドバ | TG | トーゴ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GH | ガナ | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BB | ババルバドス | GN | ギニア | MK | マケドニア共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| BE | ベルギー | GW | ギニア・ビサウ | ML | マリ | TR | トルコ |
| BG | ブルガリア | GR | ギリシャ | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BJ | ベナン | GU | グアテマラ | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| BY | ベラルーシ | DE | ドイツ | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CC | カカス | IE | アイルランド | MX | メキシコ | UY | ウルグアイ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IL | イスラエル | NE | ニジェール | VN | ベトナム |
| CG | コンゴ | IT | イタリア | NL | オランダ | ZW | ジンバブエ |
| CH | スイス | JP | 日本 | NZ | ニュージーランド | | |
| CI | コートジボワール | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CM | カメルーン | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |
| CN | 中国 | KZ | カザフスタン | RU | ロシア | | |
| CU | キューバ | LC | セント・ルシア | SE | スウェーデン | | |
| CC | キプロス | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール | | |
| CZ | チェコ | LK | スリランカ | SI | スロベニア | | |
| DE | ドイツ | LS | レソト | SK | スロバキア | | |
| DK | デンマーク | | | SL | シエラレオネ | | |
| EE | エストニア | | | | | | |

明細書

固体表面の処理剤

技術分野

本発明は医療用具、医薬品容器等の固体表面からエンドトキシン及び／または $(1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{グルカン}$ （これらを含めて、後に定義するように「リムルス反応性物質」という）を簡便かつ効率良く遊離させるための方法、その方法に用いる処理剤、その処理剤の使用及びカプトガニ・アメボサイト・ライセートを用いたリムルス反応によるリムルス反応性物質の測定において、医療用具、医薬品容器等の固体表面からエンドトキシン及び／または $(1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{グルカン}$ を簡便かつ効率良く遊離させることにより、エンドトキシン及び／または $(1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{グルカン}$ の検出感度を著しく高め、該医療用具、医薬品容器等の適切な安全性評価を可能にする測定法に関する。

背景技術

カプトガニ・アメボサイト・ライセート（以下単にライセートともいう）のC因子を利用して、発熱物質であるエンドトキシンを測定する方法が知られており、ウサギの発熱性試験の代替法として公定法にも採用されている。この方法は、微量のエンドトキシンによりライセートが凝固することに基づいているが、その後の生化学的解明により、該反応はいくつかの凝固因子の段階的活性化より成ることが明かにされている（図1）（中村隆範、日本細菌学雑誌、38、781-803（1983））。この反応の引き金となるエンドトキシンは、グラム陰性菌細胞壁の外膜成分で、リポ多糖（LPS）ともよばれており、親水性の糖鎖と疎水性のリピドA部分が分子内に局在した両親媒性物質である。

エンドトキシンは、生体内では微量でも発熱作用があり、TNF、IL-1等の炎症性サイトカインの遊離やショックの誘発ならびに致死作用等様々な生物活性（毒性）が知られており、人体への混入は極力避けねばならない。FDAは1978年にウサギ発熱性試験の代替法としてのリムルステストによるエンドトキシン試験のガイドラインを作成したが、それ以降、医薬品の安全性試験に本テス

トが広く適用されるに至っている。

エンドトキシンのサブユニットは、通常の条件では、疎水結合、イオン結合等で巨大な分子集合状態（会合体）を形成し、蛋白や脂質等とも複雑なミセルを形成することが知られており、このミセル構造は、リムルス反応にも大きく影響し、最大活性を示す分子サイズとそのミセル構造が存在する。また、両親媒性であるエンドトキシンはその親水基と疎水基を介して、種々の物質や担体に吸着する。特に、プラスチックには、条件によっては強く吸着する性質を有する。従って、プラスチック器具に吸着したエンドトキシンは、単に蒸留水のみでは全く遊離されず、体液たとえば血液等に接触してはじめて遊離することもあり得るため、従来の蒸留水による遊離液を用いてリムルステストでこれら器具のエンドトキシン汚染を検出する方法ではエンドトキシンが正確に検出できない危険性も指摘されている。そのため、たとえエンドトキシン汚染があっても、従来の試験法では適合するケースがあり、人体とりわけ免疫能が低下した易感染性患者へのこれら医療用具の適用は、医療上大きな問題を提起することになる。

さらに、外科領域や救急医療の場においても、エンドトキシンの日常管理は、感染症、とくに敗血症の病態把握と治療及び予後の判定、術後のモニタリング等にきわめて重要となっており、血液透析患者における透析液の安全管理にも不可欠な項目である。そのため、治療を主たる目的とした医療用具の安全性には特に厳重な注意が必要である。

一方、ライセートのG因子を利用して、エンドトキシンとは別に（1→3）-β-D-グルカンを測定する方法が知られている。この反応の引き金となる（1→3）-β-D-グルカンは、酵母、キノコ、カビ等の真菌類及び高等植物の細胞壁成分として、自然界に広く分布し、マクロファージからのTNF、IL-1、IL-6等のサイトカインの産生誘導、（1→3）-β-D-グルカンリセプターを介した補体系の活性化、網内系の活性化、抗腫瘍作用等の多彩な生物活性を示す。また、エンドトキシンの作用を高める相乗効果を有する場合もあるため、種々医薬品ならびに医療用具等への（1→3）-β-D-グルカンの混入も医療上重要な問題になりつつある。

薬事法により定められている医療用具基準におけるリムルス試験に供する試料

溶液の調製法として、各種の加熱温度と加熱時間が記載されているが、大部分が苛酷な抽出条件（70℃など）を採用しており、また対象医療用具ごとにその方法が異なっている。さらに、低濃度のエンドトキシンの場合、特にこれらの処理に伴うエンドトキシンの不活化という問題が指摘されており、該用具に付着または吸着されている活性なエンドトキシン濃度を正確に測定すること、即ち、適切な安全性評価が困難である（ジャーナル・オブ・アンチバクテリアル アンチファンガス エージェント（J. Antibact. Antifung. Agents), 19, 561-566 (1991)）という問題があった。また、ヒト血清アルブミン（HSA）やグロブリンを抽出剤として用いるエンドトキシン測定法が知られている（特開平5-255405）が、アルブミンやグロブリン溶液自体からエンドトキシンを除去あるいは失活させる操作が煩雑で、かつこれら操作を確実に行うことが困難である点やヒト由来の病原性微生物（HIV、マイコプラズマ等）が、抽出剤に混入する危険性もあるという問題があり、実用的方法とは言えないものであった。更に、該抽出剤は、貴重な血液から調製されるため価格も高くかつ貴重な資源の有効な利用とは言えないものである。

本発明は、医療用具、医薬品容器等の固体表面に付着または吸着したリムルス反応性物質を簡便かつ効率良く遊離させ得る衛生上安全で低価格な方法、その方法に用いる処理剤、その処理剤の使用とそれを用いたリムルス反応性物質の測定法を提供するものである。

発明の開示

本発明は、以下の構成からなる。

1) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面にキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤を接触させ、リムルス反応性物質を遊離させることを特徴とする固体表面の処理方法。

2) リムルス反応性物質がカプトガニ・アメボサイト・ライセートのC因子系を活性化する物質又はG因子系を活性化する物質であることを特徴とする前記1)に記載の固体表面の処理方法。

3) C因子系を活性化する物質がエンドトキシンであり、G因子系を活性化する物質が(1→3)-β-D-グルカンであることを特徴とする前記2)に記載

の固体表面の処理方法。

4) 界面活性剤が非イオン性界面活性剤又は陰イオン性界面活性剤であることを特徴とする前記1)～3)の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

5) 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン類及びポリエチレングリコールから選択されることを特徴とする前記4)に記載の固体表面の処理方法。

6) 陰イオン性界面活性剤がアルキル硫酸塩であることを特徴とする前記4)に記載の固体表面の処理方法。

7) キレート剤がクエン酸、エチレンジアミン4酢酸及びそれらの塩から選択されることを特徴とする前記1)～3)の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

8) 固体表面が合成樹脂、天然樹脂、合成繊維、天然繊維、金属及びガラスから選択される表面であることを特徴とする前記1)～7)の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

9) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面からリムルス反応性物質を遊離させるために用いられ、キレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有することを特徴とする固体表面の処理剤。

10) 有効成分がエチレンジアミン4酢酸、その塩及びポリエチレングリコールからなることを特徴とする前記9)に記載の固体表面の処理剤。

11) 有効成分がポリオキシエチレンソルビタン類、ポリエチレングリコール及びエチレンジアミン4酢酸又はその塩からなることを特徴とする前記9)に記載の固体表面の処理剤。

12) リムルス反応性物質が付着又は吸着された固体表面から、リムルス反応性物質を遊離させる処理へのキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分とする処理剤の使用。

13) リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面をキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤で処理して得られた処理液にリムルス試薬を作用させることを特徴とするリムルス反応性物質の測定法。

本発明において、キレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分とする処理剤に

より種々材質の医療用具、医薬品容器等の表面を処理し、器材の表面に付着又は吸着したリムルス反応性物質、即ち、エンドトキシン及び／又は $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカンを簡便かつ効率良く遊離させることができる（以下、前記処理剤を「本発明の処理剤」ともいう）。

また、本発明は、本発明の処理剤により固体表面を処理した処理液にリムルス試薬を作用させてリムルス反応性物質を精度良く測定することができる。なお、本発明の処理剤は、水溶液の状態で、長期間安定したリムルス反応性物質の遊離効果を示す。

本発明において「リムルス反応性物質」とは、ライセート成分に作用し、リムルス反応を惹起させる物質を意味し、C因子系（成分として少なくともC因子、B因子及び／又は凝固酵素前駆体を含む）を活性化するエンドトキシン及びG因子系（成分として少なくともG因子及び／又は凝固酵素前駆体を含む）を活性化する $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカンなどを意味する。

ライセートは、カプトガニのアメボサイト（血球細胞）をホモゲナイザー等適当な方法により抽出することにより調製される。

また、本発明のリムルス反応性物質の測定法に使用されるリムルス試薬としては、ライセートを原料として得られた試薬であれば、いずれも使用できる。このようなリムルス試薬としては具体的には、リムルス・ポリフェムス、タキプレウス・トリデンタツス、タキプレウス・ギガス、タキプレウス（カルシノスコルピウス）・ロツンディカウダ等のカプトガニの血リンパ液から、公知の方法（例えば、ジャーナル・オブ・バイケミストリー(J. Biochem.), 80, 1011-1021(1976))で調製した通常のライセート、及びG因子の反応を排除したエンドトキシン特異的ライセート、及びこれらのライセートにさらに合成基質を加えて調製した合成基質法用エンドトキシン特異的試薬（特公平2-18080、特公平3-18080、オバヤシ ティー 等(Obayashi T. et.al.), クリニカ キミカ アクタ(Clin. Chim. Acta), 149, 55-65(1985)）ならびにC因子の反応を排除した $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカン特異的ライセート（特開平4-285859）、及びさらにこれらのライセートに合成基質を加えて調製した合成基質法用 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ グルカン特異的試薬（特開平4-285859）などから選ばれたリムルス試薬などが挙げられる。また、本発明の測定法を合成基質法リムル

ス試薬を用いて行くと精度が高く、コアギュローゲンを使う必要がないという利点があるが、これに限定されず、ゲル化法リムルス試薬やゲル化反応を応用した比濁法リムルス試薬を用いて行うこともできる。

従って、本発明の測定法においては、エンドトキシンに特異的又は(1→3)－β-D－グルカンに特異的なリムルス試薬を選定することにより固体表面に存在するリムルス反応性物質がエンドトキシンであるのか、(1→3)－β-D－グルカンであるのかを特定することができる。

本発明の処理剤は、キレート剤及び界面活性剤の両者又は一方を少なくとも有効成分として含有するものである。

本発明に用いることが出来るキレート剤としては、金属イオンへの配位により環状構造(キレート環)を形成する化合物であれば、特に限定されないが、分子内に酸素、窒素ないしはイオウを複数個有し、配位により5～6員環構造を形成し得る有機化合物がより望ましい。具体的には、クエン酸、エチレンジアミン4酢酸(EDTA)、ジアミノプロパン4酢酸(Methyl-EDTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン3酢酸(EDTA-OH)、グリコールエーテルジアミン4酢酸(GEDTA)、N,N-ビス(2-ヒドロキシベンジル)エチレンジアミン-N,N-2酢酸(HBED)、ニトリロ3酢酸(NTA)、ジエチレントリアミン5酢酸(DTPA)等のアミノポリカルボン酸、又はこれら化合物の塩(ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等)等が使用でき、これらは単独又は組み合わせて用いることができる。好ましいキレート剤としては、クエン酸、エチレンジアミン4酢酸又はそれらの塩が挙げられる。

本発明の処理剤に用いられる界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤又は陰イオン性界面活性剤が好ましい。

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン類、ポリエチレングリコール等が好ましく、これらは単独又は組み合わせて用いられる。また、これら非イオン性界面活性剤は、キレート剤、例えば、エチレンジアミン4酢酸又はその塩等と併用すると特に有効である。

本発明に用いることが出来るポリオキシエチレンエーテル類としては、Triton系としてポリオキシエチレン-p-ターシャリーオクチル(又はイソオク

チル) フェニルエーテル (重合度 8 ~ 40)、ポリオキシエチレン-4-ターシャリーオクチル (又はイソオクチル) フェニルエーテル (重合度 8 ~ 40)、ポリオキシエチレン-p-ノニルフェニルエーテル (重合度 10 ~ 20)、Brij系としてポリオキシエチレンドデシルエーテル (重合度 10 ~ 29) などが挙げられ、これらは単独又は組み合わせて用いられる。ポリオキシエチレンソルビタン類としてはポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンエーテルモノステアレート (Tween系) などを挙げることが出来、これらは単独又は組み合わせて用いられる。さらに、ポリエチレングリコール (PEG) としては、エチレングリコールの重合体で平均分子量が 200 ~ 2,000,000、好ましくは 2,000 ~ 200,000、さらに好ましくは 4,000 ~ 20,000 のものを挙げることができ、これらは単独又は組み合わせて用いられる。

また、本発明に用いることが出来る陰イオン性界面活性剤としては、アルキル硫酸塩、コール酸塩、デオキシコール酸塩 (好ましくはナトリウム等のアルカリ金属塩) 等が挙げられ、好ましくはアルキル硫酸ナトリウムで、具体的にはドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を挙げることが出来る。

本発明により処理される固体表面は、リムルス反応性物質の存否の確認又は定量が必要とされる任意のものを包含し、真空採血管、注射筒、輸液用連結管、ホローファイバー型人工透析用モジュール膜、血漿交換用モジュール膜、血液回路等の医療用具等の表面が挙げられるが、これに限定されるものではなく、例えば、飲食品容器等の表面も含まれる。従って、該固体表面の素材としては、本発明の処理剤で溶解、変形等により使用し得なくなることがなければいかなる素材も含まれる。尚、本発明によりリムルス反応性物質を遊離させた処理液は、リムルス反応に供することによりその存否又は量が確認されるが、該処理液をリムルス反応に供することなく廃棄乃至一般的な水処理施設に回して良いことは言を待たない。即ち、本発明は単に固体表面から人体等に有害な作用を及ぼすリムルス反応性物質を除去する洗浄剤としての機能のみを有していてもよい。

固体表面の素材としては、具体的に、合成樹脂、天然樹脂、合成繊維、天然繊維

維、金属、ガラス等が挙げられ、これらは単独でも組み合わせられたものでもよい。例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、フェノール樹脂、メラミン樹脂、尿素樹脂、ジエン系ゴム、オレフィン系ゴム、ウレタンゴム、シリコンゴム、フッ素ゴム、多硫化ゴム等からなる合成樹脂、合成繊維；アラビアゴム、カシューゴム、アンモニアゴム、天然ゴム等の天然樹脂；綿、カボック、亜麻、ラミー、マニラ麻、羊毛、モヘア、絹、アスベスト等の天然繊維；ステンレス銅、銀、金、白金、鉄、ニッケル、クロム等の金属；軟鉄ガラス、カリガラス、硬質二級、硬質一級、タングステン、ガラス、石英ガラス等が挙げられる。

本発明の処理剤は、少なくともキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含むものであれば、基本的にその態様は制限されないが、少なくとも使用時は通常、溶液乃至懸濁液状態であり、水溶液であることが好ましい。有効成分の溶媒としては、通常、水を用いるが、リムルス反応に影響を及ぼさない程度の有機溶媒も水と組み合わせて、又は単独で 사용할 ことができる。ここで、本発明により固体表面からリムルス反応性物質を遊離させた処理液をリムルス反応に供する場合は、前記溶媒としてはリムルス反応性物質を含まないものでなければならぬが、その必要がない場合は特に制限はないので目的に応じて溶媒の質を選定すればよい。

本発明の処理剤において、キレート剤の濃度はその種類により異なるが、好ましくは0.01 mM～20 mMの範囲、より好ましくは0.1 mM～5 mMの範囲である。また、界面活性剤の濃度は、キレート剤同様その種類によっても異なるが、好ましくは0.0001%～0.5%（重量／容量）の範囲、より好ましくは0.001～0.05%（重量／容量）の範囲である。

本発明の処理剤は、また、次亜塩素酸ソーダのような殺菌剤と組み合わせて使用することもできる。すなわち、本発明の処理剤に殺菌剤を添加して、あるいは本発明の処理剤と殺菌剤を相前後して用い、固体表面を処理することができる。固体表面を処理した後に、処理済みの溶液のリムルス反応性物質を測定する場合、殺菌剤がリムルス反応に影響を与える物質である場合、影響がなくなるまで処理液を希釈することが好ましい。

本発明の処理剤を固体表面に接触させる際の接触温度は4～50℃、特に好ましくは10～30℃、接触時間は5分間～2時間、特に30分間～1時間の範囲が好ましい。ここで、接触処理の方法は、特に制限はないが、例えば、振盪処理、攪拌処理、静置等が挙げられ、処理方法により適宜、処理時間が選定される。

本発明は、このように処理した後、固体表面に付着又は吸着しているリムルス反応性物質をその活性を損なうことなく簡便に効率よく定量的に遊離させ、該物質を含む処理液を得ることができ、これと前記リムルス試薬を混合し、常法によりリムルス反応性物質を精度よく測定することができる。本発明は、それにより、より適切な医療用具や医薬品容器等の安全性評価試験を実施することができ、医療等の進歩に大きく貢献するものである。

また、本発明の処理剤を用いて医療用具や医薬品容器等の任意の固体表面を処理することにより、リムルス反応性物質のない、もしくは極めて少ない安全な固体表面を提供することができる。ここで、本発明の処理剤による固体表面の処理の後、所望により残留した本発明の処理剤を水等で除去することにより本発明の処理剤及びリムルス反応性物質を含まない固体表面を提供することができる。更に、このような本発明の処理剤による処理は、目的によりその処理回数を適宜選定することもできる。

図面の簡単な説明

図1は、リムルス反応を説明するための図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1

日局方エンドトキシン (E. coli UKT-B、control 8917) 10,000 EU/mLを蒸留水で1.0 EU/mLまで希釈し、この2 mLをファルコンチューブ 2096 (ポリプロピレン製、ベクトン・ディッキンソン社) 及びアシストチューブ No. 55.467 (ポリスチレン製、アシス

ト社)にそれぞれ分注し、マイクロミキサーMT(タイテック社)にて室温、3時間振盪し、蒸留水で充分洗浄することにより、エンドトキシン吸着チューブを調製した。該チューブに、蒸留水(対照)、0.1%ヒト血清アルブミン(比較例)ならびに種々の本発明の処理剤(キレート剤又は/及びポリエチレングリコール(PEG) #6000を含有)を2 mLずつ加え、マイクロミキサーMTで1時間振盪処理した。その処理液50 μ Lにエンドトキシン特異的リムルス試薬であるエンドスピー(生化学工業(株))を50 μ L加え、ウェルリーダーSK601(生化学工業(株))にてカイネティックアッセイ(37°C、30分間)を行い、エンドトキシン濃度を自動算出した。吸着エンドトキシンの理論値(添加量-洗浄水中の検出量)を100%として、各処理液におけるエンドトキシンの遊離効果指数(%)を求めた(表1)。尚、表1中、キレート剤とPEGとの併用の本発明の処理剤の濃度は、混合液の各成分の濃度を示す。

表1 各種キレート剤によるエンドトキシン遊離効果

| 処理剤 (% : 重量/容量) | 遊離効果 (%) | |
|---|----------|------|
| | 糸プロレン | 糸スレン |
| 蒸留水(対照) | 0 | 0 |
| ヒト血清アルブミン(HSA, 0.1%)(比較例) | 6.8 | 4.7 |
| クエン酸三ナトリウム (0.25 mM) | 11.2 | 10.1 |
| クエン酸三ナトリウム (0.25 mM), PEG#6000 (0.004%) | 18.4 | 17.8 |
| EDTA-4Na (0.5 mM) | 17.7 | 15.2 |
| EDTA-4Na (0.5 mM), PEG#6000 (0.004%) | 36.1 | 25.2 |
| EDTA-2Na (0.5 mM) | 13.5 | 10.8 |
| Methyl-EDTA (0.5 mM) | 20.5 | 17.5 |
| EDTA-OH (0.5 mM) | 28.6 | 23.8 |
| GEDTA (0.5 mM) | 24.7 | 19.0 |
| NTA (0.5 mM) | 28.7 | 19.4 |
| HBED (0.25 mM) | 30.0 | 22.5 |
| DTPA (0.25 mM) | 22.1 | 10.2 |

() 内の濃度は、処理時における処理剤の最終濃度を示す。

表1に示したように、金属イオンとの環状構造を形成するキレート剤は、すべて、固体表面からの有意のエンドトキシン遊離効果を有し、ポリエチレングリコール(PEG)の添加により効果が高まることが見いだされた。さらに、比較例としての特開平5-255405(エンドトキシンの抽出方法)記載の方法(人

血清アルブミン（HSA）使用）と比べてもその効果は著しく大きく、またこれら本発明のキレート作用を有する化合物やPEGは、すべてHSAのようなヒト由来成分ではなく、かつ病原菌混入の恐れもないため、安全性、操作性の面で優れ、また安価でもある点、実用性のきわめて高い方法であることは明らかである。

実施例 2

実施例 1 において使用したエンドトキシン吸着チューブに、蒸留水（対照）、0.1% γ -グロブリン（比較例）ならびに本発明の処理剤（界面活性剤又は/及びEDTA-4Naを含有）を2mLずつ加え、ミクロミキサーMTにて室温、1時間振盪処理した。その処理液50 μ Lにエンドスペシーを50 μ L加え、実施例 1 と同様に測定し、エンドトキシン濃度を算出した。吸着エンドトキシンの理論値（添加量－洗浄水中の検出量）を100%として、各処理液におけるエンドトキシンの遊離効果指数（%）を求めた（表2）。尚、表2中、PEGとの混合液の各成分の濃度は、混合後の濃度を示す。

表2 各種界面活性剤によるエンドトキシン遊離効果

| | 処理剤 (% : 重量/容量) | 遊離効果 (%) | |
|-----------------------------|--|----------|----------|
| | | リポロビン | リステリン |
| 対照 比較例 | 蒸留水 γ -グロブリン(0.1%) | 0 3.5 | 0 2.6 |
| ポリオキシ エチレンエー テル類 | Triron X-100 (0.005%) | 20.2 | 13.6 |
| | Triton X-114 (0.005%) | 15.5 | 14.0 |
| | Triton WR-1339 (0.005%) | 14.7 | 11.4 |
| | Tyroxapol (0.005%) | 18.2 | 9.8 |
| | Tergitol (0.005%) | 10.7 | 8.3 |
| ポリオキシ エチレンソル ビタン類 | Tween 20 (0.01%) | 21.3 | 18.8 |
| | Tween 40 (0.01%) | 21.2 | 20.0 |
| | Tween 80 (0.01%) | 21.3 | 16.5 |
| | Tween 85 (0.01%) | 22.5 | 17.8 |
| アルキル 硫酸塩 | SDS | 10.2 | 7.2 |
| ポリエチレン グリコール ／混合 液 | PEG#6000 (0.004%) | 0.1 | 0 |
| | Triton X-100 (0.005%), PEG#6000 (0.004%) | 20.5 | 14.7 |
| | Tween 20 (0.01%), PEG#6000 (0.004%) | 28.5 | 20.0 |
| | Tween 20 (0.01%), PEG#6000 (0.004%) , EDTA-4Na (0.5 mM) | 38.9 | 30.4 |

() 内の濃度は、処理時における処理剤の最終濃度を示す。

表2に示したように、ポリオキシエチレンエーテル類又はポリエチレンソルビタン類から成る界面活性剤はすべて、有意のエンドトキシン遊離効果を有し、これらの界面活性剤とさらにPEGを添加した際に、キレート剤と同様にPEGの促進効果が認められた。さらに、PEGとキレート剤を共存させた場合はその効果は一層高まることが確認された。これら界面活性作用を有する化合物はすべてHSAや γ -グロブリンの場合のような病原菌混入の恐れがないため、キレート剤と同様に、安全性、操作性の面で優れ、また安価でもある点、実用性の高い方法であることは明らかである。

実施例3

実施例1において使用したエンドトキシン吸着チューブに、EDTA-4Na

とPEG#6000の混合液（それぞれ0.5mM、0.004%）を2mLずつ加え、マイクロキサーMTにて4℃、10℃、25℃、30℃、37℃、50℃で1時間振盪処理した。その処理液50μLにエンドスペーを50μL加え、実施例1と同様に測定し、エンドトキシン濃度を算出した。吸着エンドトキシンの理論値（添加量－洗浄水中の検出量）を100%として、各処理液におけるエンドトキシンの遊離効果指数（%）を求めた（表3）。

表3 エンドトキシン遊離効果に及ぼす処理温度の影響

| 処理剤 | 温度 (℃) | 遊離効果 (%) | |
|----------|-----------|----------|-------|
| | | リポビリン | リステリン |
| 蒸留水 (対照) | 4 | 0 | 0 |
| | 10 | 0.1 | 0 |
| | 25 | 0.2 | 0.1 |
| | 30 | 0.5 | 0.2 |
| | 37 | 0.5 | 0.2 |
| | 50 | 0.4 | 0.1 |
| 処理剤 | 4 | 27.0 | 18.7 |
| | 10 | 34.8 | 23.6 |
| | 25 | 37.2 | 25.8 |
| | 30 | 36.9 | 27.8 |
| | 37 | 33.0 | 22.5 |
| | 50 | 32.5 | 22.0 |

表3に示したように、固体表面をキレート剤及び界面活性剤を有効成分として含有する本発明による処理剤で処理することにより、4℃の条件下でも、対照（蒸留水で処理した場合）に比べ著しく高いエンドトキシンの遊離効果が認められたが、接触温度を10℃以上に上げることによりさらにその効果が高まることが明らかとなった。

実施例4

各種滅菌ディスポーザブル器具類及び医療用具のそれぞれに、Tween20、PEG#6000及びEDTA-4Naの混合液（それぞれ0.01%、0.004%、0.5mM）を2mL加え、マイクロキサーMTにて室温、1時間振盪処理した。手術用ゴム手袋又は輸液セットの場合は、200mLの上記処理液

に浸し、室温で3時間振盪処理後、その処理液50 μ Lにエンドスペシーを50 μ L加え、蒸留水処理を対照として、実施例1と同様に測定し、エンドトキシン濃度を算出した(表4)。

表4 各種滅菌済みプラスチック器具類及び医療用具中のエンドトキシン濃度

| | エンドトキシン(EU/L) | | | エンドトキシン(EU/L) | |
|---|---------------|-------|---------------------|---------------|----------|
| | 蒸留水 | 処理剤 | | 蒸留水 | 処理剤 |
| プラスチック試験管 ポリプロピレン 製品A " B " C ポリスチレン 製品D " E | 5.0 | 20.0 | シリンジ 製品I " J | 1.0 0 | 5.0 0 |
| | 0 | 5.0 | チップ 製品K " L | 0 | 1.0 |
| | 0 | 0 | | 0 | 4.0 |
| | 1.0 | 2.0 | 輸液セット 製品M " N | 0 | 1.0 |
| | 0 | 0 | | 1.0 | 150.0 |
| 採血管 製品F " G " H | 0 | 0 | 手術用手袋 製品O " P | 2.0 | 108.0 |
| | 0 | 20.0 | | 0 | 1.0 |
| | 120.0 | 640.0 | | | |

表4から明らかなように、今回検討した滅菌済みプラスチック器具類及び医療用具中には、通常の蒸留水処理ではまったく検出されない(定量試薬の検出限界以下)が、本発明による処理剤を用いるとはじめて検出される場合があることが判明した。

実施例5

実施例4で用いた製品と同一ロットの器具類及び医療用具を使用して同様に処理を行い、その処理液50 μ Lに(1→3)- β -D-グルカン特異的リムルス試薬であるグルスペシー(生化学工業(株))を50 μ L加え、ウェルリーダーSK601にてカイネティックアッセイ(37℃、30分間)を行い、(1→3)- β -D-グルカン濃度を自動算出し、蒸留水処理した対照と比較した(表5)。

表5 各種滅菌済みプラスチック器具類及び医療用具中の(1→3)- β -D-グルカン濃度

| | (1→3)- β -D-グルカン (ng/L) | | | (1→3)- β -D-グルカン (ng/L) | |
|---|----------------------------------|-------|-----------------------|----------------------------------|------------|
| | 蒸留水 | 処理剤 | | 蒸留水 | 処理剤 |
| プラスチック試験管 ポリプロピレン 製品A " B ポリスチレン 製品D | 0 | 2.0 | シリンジ 製品I | 0 | 5.0 |
| | 0 | 10.6 | " J | 0 | 0 |
| | 20.1 | 71.7 | チップ 製品K " L | 0 1.0 | 0 12.6 |
| 採血管 製品F " H | 0 | 0 | 輸液セット 製品N | 3.5 | 9.8 |
| | 25.7 | 125.0 | 手術用ゴム手袋 製品O " P | 0 0 | 5.1 0.1 |

表5から明らかなように、今回検討した滅菌済みプラスチック器具類及び医療用具中には、通常の蒸留水処理では全く検出されない微量の(1→3)- β -D-グルカン汚染があり、本発明による処理剤を用いるとはじめて検出される場合があることが判明した。

通常、医療用具の発熱性試験のための検体調製としては、エンドトキシンを対象とした場合は温和な抽出条件で行い、化学的発熱物質を対象とした場合は比較的苛酷な条件を用いて抽出効率を高める方法が知られている。FDAガイドラインによる医療用具のリムルス試験のための溶出／抽出条件として、最小抽出時間は、37℃で15分間、室温(18℃以上)で1時間あるいは、他の実証された同等の条件とすると定められている。

しかしながら、実施例3に示したように、上記条件下で当該プラスチック器具類を抽出しても、何らその抽出効果が見られないことは明白である。また、HSAや γ -グロブリンを用いた例でもその効果は甚だしく不充分であり、しかも病原性微生物混入の危険性があり、安全性の面でも問題が大きく使用に耐えうるものではない。

産業上の利用可能性

上述した状況を踏まえ、本発明はリムルス反応性物質が付着又は吸着された固体表面からリムルス反応性物質を遊離させるための処理剤を提供する。本発明により、滅菌器具類、医療用具中のリムルス反応性物質の汚染、とりわけ通常の抽出法では検出されない素材に強く結合した潜在的エンドトキシン及び／又は(1→3)- β -D-グルカンの汚染をより適切に把握することができ、該用具の安全かつ簡便な安全性評価試験を行うことが可能である。これにより、より安全な医療行為が達成でき、医療の質的向上につながる。

請求の範囲

1. リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面にキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤を接触させ、リムルス反応性物質を遊離させることを特徴とする固体表面の処理方法。

2. リムルス反応性物質がカプトガニ・アメボサイト・ライセートのC因子系を活性化する物質又はG因子系を活性化する物質であることを特徴とする請求項1に記載の固体表面の処理方法。

3. C因子系を活性化する物質がエンドトキシンであり、G因子系を活性化する物質が(1→3)- β -D-グルカンであることを特徴とする請求項2に記載の固体表面の処理方法。

4. 界面活性剤が非イオン性界面活性剤又は陰イオン性界面活性剤であることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

5. 非イオン性界面活性剤がポリオキシエチレンエーテル類、ポリオキシエチレンソルビタン類及びポリエチレングリコールから選択されることを特徴とする請求項4に記載の固体表面の処理方法。

6. 陰イオン性界面活性剤がアルキル硫酸塩であることを特徴とする請求項4に記載の固体表面の処理方法。

7. キレート剤がクエン酸、エチレンジアミン4酢酸及びそれらの塩から選択されることを特徴とする請求項1～3の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

8. 固体表面が合成樹脂、天然樹脂、合成繊維、天然繊維、金属及びガラスから選択される表面であることを特徴とする請求項1～7の何れか1項に記載の固体表面の処理方法。

9. リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面からリムルス反応性物質を遊離させるために用いられ、キレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有することを特徴とする固体表面の処理剤。

10. 有効成分がエチレンジアミン4酢酸、その塩及びポリエチレングリコールからなることを特徴とする請求項9に記載の固体表面の処理剤。

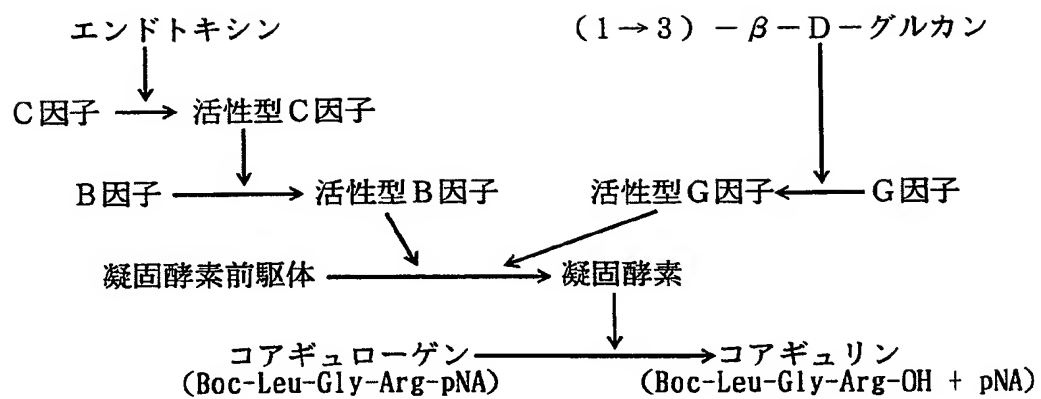
11. 有効成分がポリオキシエチレンソルビタン類、ポリエチレングリコール

及びエチレンジアミン 4 酢酸又はその塩からなることを特徴とする請求項 9 に記載の固体表面の処理剤。

1 2. リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面から、リムルス反応性物質を遊離させる処理へのキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分とする処理剤の使用。

1 3. リムルス反応性物質が付着又は吸着した固体表面をキレート剤及び／又は界面活性剤を有効成分として含有する処理剤で処理して得られた処理液にリムルス試薬を作用させることを特徴とするリムルス反応性物質の測定法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ G01N33/579, A61L2/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ G01N33/579, A61L2/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | |
|----------------------------|-------------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1926 - 1998 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971 - 1995 |
| Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994 - 1998 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP, 4-135559, A (Amutekku K.K.), May 11, 1992 (11. 05. 92), Claims; page 3, upper right column (Family: none) | 1 - 13 |
| Y | JP, 8-336589, A (Norikiyo Tanaka), December 24, 1996 (24. 12. 96), Par. Nos. (0012), (0013) & EP, 737482, A2 | 1 - 13 |
| Y | JP, 8-75751, A (Seikagaku Corp.), March 22, 1996 (22. 03. 96), Claims; Par. Nos. (0002), (0019) to (0023) & EP, 690308, A2 & US, 5648230, A | 1 - 13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 20, 1998 (20. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

March 3, 1998 (03. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/00398

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶. G 0 1 N 3 3 / 5 7 9、A 6 1 L 2 / 1 8

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶. G 0 1 N 3 3 / 5 7 9、A 6 1 L 2 / 1 8

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1 9 2 6 - 1 9 9 8 年

日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 1 9 9 5 年

日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 1 9 9 8 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| Y | J P, 4-135559, A (アムテック株式会社) 11. 5 月. 1992 (11. 05. 92)、特許請求の範囲、第3ページ 右上欄 (ファミリーなし) | 1-13 |
| Y | J P, 8-336589, A (田仲紀陽) 24. 12月. 199 6 (24. 12. 96)、【0012】~【0013】&EP, 7 37482, A2 | 1-13 |
| Y | J P, 8-75751, A (生化学工業株式会社) 22. 3月. 1996 (22. 03. 96)、特許請求の範囲、【0002】、 【0019】~【0023】&EP, 690308, A2&US, 5648230, A | 1-13 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 02. 98

国際調査報告の発送日

03.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3252